

تأثیر آنزیمهای آمیلاز، پسین و پاپاین بر میزان کاندیدایی قطعات رزین آکرil

دکتر عباسعلی جعفری ندوشن^۱ دکتر عباس فلاح تفتی^{۲*} پرنیان امامی^۳ حسن عشوری^۴

۱- دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۲- استادیار گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۳- دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

۴- دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی و عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

خلاصه:

سابقه و هدف: دنچر استوماتیت از عوارض دنچر است که اغلب بدنال کلونیزاسیون کاندیدای دهانی بر روی آن ایجاد می شود. کنترل پلاک میکروبی دنچر با روشهای مکانیکی و شیمیایی برای پیشگیری از این ضایعه لازم است. هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین تاثیر محلول های آنزیمی آمیلاز، پسین و پاپاین بر میزان پلاک کاندیدا آلبیکنس بر روی پلاکهای رزین آکرil بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ابتدا بر روی ۲۲۰ قطعه پلاک رزین آکرلی بیوفیلم کاندیدایی تشکیل شد. سپس تعداد سلول های کاندیدا چسبیده به ۲۰ قطعه که بطور تصادفی انتخاب شده بودند. پس از شستشو و رنگ آمیزی با کریستال ویوله در زیر میکروسکوپ نوری تعیین گردید. سپس تعداد ۲۰۰ قطعه از پلاک های آکرلی باقیمانده آلوده شده را بطور تصادفی به ۴ گروه ۵۰ تایی تقسیم و در محلول سه آنزیم مورد بررسی وهمچنین آب مقطر استریل (کنترل منفی) قرار داده و مدت ۸ ساعت در دمای اتاق غوطه ور شدند؛ مجددا میزان سلول های کاندیدای چسبیده به قطعات رزین مانند مرحله قبل محاسبه و داده ها با کمک تستهای ANOVA و t test با استفاده از نرم افزار SPSS مقایسه شدند.

یافته ها: میزان سلول های کاندیدا متصل صفحات آکرلی در هر میدان دید پس از ضد عفونی در محلول پاپاین $2/39 \pm 0/76$ ، پسین $7/14 \pm 1/47$ و آمیلاز $8/22 \pm 1/29$ و در گروه کنترل منفی، $9/66 \pm 1/54$ بود. و بین سه محلول تفاوت معنی داری وجود داشت. ($P=0/001$)، آنزیم پاپاین ۷۸/۹ درصد از سلول های کاندیدای متصل شده به قطعات آکرلی را پاک نمود در حالی که آنزیم آمیلاز دارای حداقل خواص پاک کنندگی بوده و تنها ۲۷/۴٪ سلول های کاندیدای چسبیده به قطعات دنچر را پاک نمود.

نتیجه گیری: به نظری رسد آنزیم پاپاین بیشترین تاثیر در کاهش پلاک کاندیدایی چسبیده به قطعات رزین آکرلی را دارد.

کلید واژه ها: رزین اکریلیک، پسین، بیوفیلم

وصول مقاله: ۹۱/۱۲/۱۵ اصلاح نهایی: ۹۲/۳/۵ پذیرش مقاله: ۹۲/۴/۹

مقدمه:

خود عوارضی از جمله سوزش دهان و احساس درد، تحلیل استخوان ریج و مهم تر از همه، برخی ضایعات پاتولوژیک را بدنال دارند. (۷) یکی از مهم ترین این عوارض پاتولوژیک، ضایعه التهابی مخاطی شایع به نام دنچر استوماتیت است؛ به طوری که حدود دو سوم افرادی که از دنچر کامل استفاده می کنند، ممکن است به این ضایعه مبتلا شوند. (۸،۹) عوامل ایجاد کننده دنچر استوماتیت، به دو دسته کلی پروتزی (ناشی از ترومای دنچر) و عفونی (اغلب ناشی از گونه های مختلف کاندیدای دهانی) تقسیم می شوند که در این میان پاتوژن اصلی و عمده در ایجاد دنچر استوماتیت، کاندیدا آلبیکنس

بی دندانی مشکلات زیادی را از جمله اختلال در جویدن و صحبت کردن، کاهش زیبایی و بوی بد دهان ایجاد می کند. (۱-۴) مبتلایان به بی دندانی، از روش های جایگزینی دندان ها برای درمان استفاده می کنند که شایع ترین روش، استفاده از پروتزهای کامل متحرک ساده یا دنچر (Denture) است. (۵،۶) انتظار

می رود که دنچرها بتوانند وظایفی مشابه دندان های طبیعی را انجام دهند ولی با وجود موثر بودنشان در جایگزینی دندان ها،

پلاک های جدید نیز جلوگیری می کنند؛ این در حالی است که آنزیم ها برای بافت های زنده ضرری ندارند.

هدف از انجام مطالعه حاضر تعیین میزان تاثیر محلول های آنزیمی آمیلاز، پپسین و پاپایین جهت کنترل پلاک تجربی کاندیدا آلبیکنس بر روی قطعات رزین آکريل آلوده بوده است.

مواد و روش ها:

* مطالعه به روش تجربی و در مراحل زیر انجام شد:

الف: ساخت قطعات آکريل

یک قالب گچی درون مفل، با استفاده از گچ استون (مولدستن-پارس دندان) تهیه شد. برای این منظور یک لایه موم نازک (تکفام-ایران) در ابعاد $5 \times 55 \times 55$ میلی متر مفل گذاری شده و بعد از مرحله حذف موم، به قالب گچی بیوفيلم (آکروپارس، مارلیک-تهران) زده شد. در زمان خشک شدن بیوفيلم، پودر و مونومر آکريل پختنی (آکروپارس، مارلیک - تهران) در یک لیوان شیشه ای با هم مخلوط شدند و سپس در مرحله خمیری (Dough) آکريل گذاری انجام و مفل در دستگاه پرس هیدرولیک-(Kavo) آلمان قرار گرفت. پس از ۴۵ دقیقه مفل تحت فشار، در ظرف مخصوص پخت آکريل گذاشته شد و بعد از به جوش آمدن آب، به مدت ۲۰ دقیقه درون ظرف نگهداشته و سپس مفل باز گردید و ورقه آکريلي حاصله با احتیاط برداشته شد. برای برش ورقه آکريلي به قطعات 10×10 میلی متر از دیسک فلزی و هندپیس استفاده گردید. با ۱۰ مرتبه تکرار این مراحل، ۲۲۰ قطعه آکريلي یک شکل و یک اندازه و با ضخامت یکسان بدست آمد. (شکل ۱)



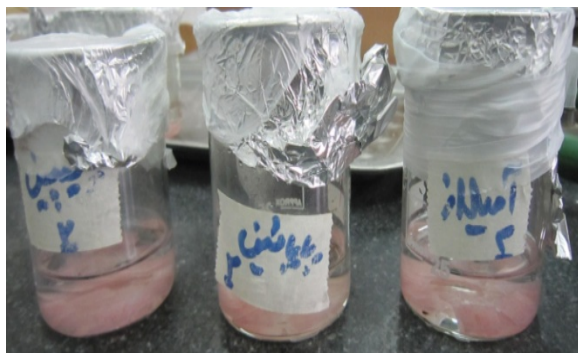
شکل ۱- قطعات آکريلي ساخته شده جهت تشکیل

پلاک کاندیدایی تجربی

است، به طوری که این گونه کاندیدا در ۹۳ درصد از مبتلایان، ایزوله شده است.^(۱۰-۱۲) این عوامل عفونی، به صورت پلاک هایی روی دنچر نقش می بندند که معمولاً در صورت بلع یا از طریق مخاط آسیب دیده دهان می توانند منجر به عفونت های سیستمیک با قارچ کاندیدا، پنومونی و حتی بیماری های قلبی بخصوص در افراد ایمنوساپرس شوند.^(۱۳) برای پیشگیری از دنچر استوماتیت، راه های مختلفی از جمله عدم استفاده از دنچر در طول شب، خارج کردن دنچر از دهان به مدت ۶ تا ۸ ساعت در شبانه روز، مراجعه به دندانپزشک در فواصل زمانی منظم به منظور معاینه جهت غربالگری دنچر استوماتیت و بررسی وضعیت دنچر، پیشنهاد شده است و یکی از موثرترین این اقدامات، رعایت بهداشت و کنترل پلاک با شستشوی مکانیکی و استفاده از محلول های ضدعفونی کننده مناسب است.^(۱۴) مواد ضدعفونی کننده شیمیایی مختلفی مانند کلرهگزیدین، گلو تار آلدهاید، الکل ها، پراکسید هیدروژن، یدوفورها، فنول ها و هیپوکلریت سدیم وجود دارند که علی رغم مزیت هایی که دارند، خالی از معایب و عوارض نیستند.^(۱۵-۱۹) بعضی از این مواد شیمیایی باعث بروز حساسیتهای مخاطی در افراد استفاده کننده شده و یابعضی مانند سدیم هیپوکلرید علاوه بر بوی نامطبوع باعث تغییر رنگ دنچر و خوردگی بر روی فلزات مورد استفاده در پروتزهای دهانی نیز میشوند. گلو تار آلدهیدها دارای خواص سمی بوده و یا استفاده از ماکروبو در ضد عفونی دنچر نیز میتواند باعث تغییراتی در ثبات ابعادی دنچر شود.^(۱۷، ۱۸) اخیراً مطالعاتی بر روی تاثیر مواد خانگی مانند سرکه و آنزیمهای پروتئولیتیک^(۲۲) جهت ضد عفونی رزین آکريل و پروتزهای دهانی انجام شده است و مزایا و معایبی برای هر کدام ذکر شده است. Canay و همکاران تاثیر آنزیمهای تریپسین و پاپایین را بر روی کلونیزاسیون کاندیدایی روی رزین آکريل بررسی کرده و پاپایین را در کنترل کلونیزاسیون کاندیدا موثر گزارش نمودند ولی پپسین را با اثر محدود گزارش نمودند.^(۲۱) آنزیم ها بر باکتری ها و قارچ ها مؤثرند و علاوه بر از بین بردن جرم های قدیمی، از تشکیل

د: روش بررسی میزان پاک کنندگی و ضد عفونی مواد مورد مطالعه:

در این مطالعه تجربی ابتدا غلظت های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنزیم های آمیلاز (Serva, USA) پپسین (Germany, Merck)، پاپائین (Serva, USA) به کمک محلول بافر سالین فسفات (Phosphate Buffered Saline, PBS) در محدوده pH برابر ۷/۲ تهیه گردید. سپس تعداد ۲۰۰ قطعه از پلاک های آکرلی آلوده شده با سوسپانسیون کاندیدا بطور تصادفی به ۴ گروه ۵۰ تایی تقسیم شدند و ۳ گروه از آنها در سه بشر استریل حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول آنزیمهای مورد بررسی (آکرلی ها را به طور کامل بپوشاند) و گروه چهارم در بشر حاوی آب مقطر استریل به عنوان گروه کنترل، غوطه ور و بمدت ۸ ساعت در دمای اتاق روی شیکر (rpm 100) نگهداری شدند (شکل ۲)



شکل ۲- روش غوطه وری قطعات آکرلی آلوده شده در محلول های آنزیم های مورد بررسی جهت ضد عفونی

پس از انکوباسیون قطعات آکرلی با محلول های آنزیم و آب مقطر، بلافاصله سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته و بعد از خشک شدن بلافاصله با متانول ۸۰ درصد فیکس و به مدت ۱ دقیقه در ظرف حاوی رنگ کریستال ویوله جهت رنگ آمیزی غوطه ور و بلافاصله با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. در پایان سلول های کاندیدای چسبیده به قطعات آکرلی، با کمک میکروسکوپ نوری زایس با بزرگنمایی $\times 400$ شمارش شده و میانگین سلول های شمارش شده در سه میدان دید میکروسکوپ محاسبه و به عنوان تعداد سلولهای کاندیدا

برای جلوگیری از دهیدراته شدن قطعات آکرلی، آنها درون یک ظرف استریل حاوی آب مقطر استریل غوطه ور و سپس اتوکلاو شده و تا زمان استفاده، در یخچال نگهداری شدند.

ب: روش تهیه سوسپانسیون سلولی کاندیدا

با کشت کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) بر روی محیط کشت تازه ساپروکستروز آگار و انکوباسیون آن در حرارت ۳۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت، کلنی های تازه این قارچ تهیه شد. سپس یک کلنی از قارچ مذکور در داخل یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون تهیه و با استفاده از لام نفوبار تعداد سلولهای کاندیدا، شمارش گردید و با تهیه رقت های متناوب، سوسپانسیون 1×10^6 واحد کولونی بر میلی متر سلول تهیه گردید، سپس با نسبت ۵۰ به ۵۰ با محیط کشت ساپروبراث مخلوط شد و بدین صورت سوسپانسیون 1×10^3 واحد کولونی بر میلی متر بدست آمد.

ج: روش تهیه بیوفیلم تجربی روی قطعات آکرلی:

ابتدا تعداد ۲۲۰ قطعه آکرلی تهیه شده، به مدت ۱۲ ساعت در محلول ساپروبراث حاوی 1×10^3 کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) بر روی شیکر با سرعت rpm 100 و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد غوطه ور گردید.^(۳۰) پس از انکوباسیون برای تعیین تعداد اولیه سلول های کاندیدای چسبیده به قطعات دنچر، قبل از ضد عفونی تعداد ۲۰ قطعه از قطعات دنچر آلوده شده با سوسپانسیون کاندیدا، بطور تصادفی انتخاب و سپس سه بار با ۲ میلی متر محلول سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند و پس از خشک شدن بلافاصله با متانول ۸۰ درصد فیکس و به مدت ۱ دقیقه در ظرف حاوی رنگ کریستال ویوله جهت رنگ آمیزی غوطه ور شدند. قطعات آکرلی رنگ آمیزی شده بلافاصله با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند و بعد از خشک شدن، سلولهای کاندیدای چسبیده به قطعات آکرلی، با کمک میکروسکوپ نوری زایس با بزرگنمایی $\times 400$ شمارش شده و میانگین سلول های شمارش شده در سه میدان دید میکروسکوپ محاسبه و به عنوان تعداد اولیه سلولهای کاندیدای چسبیده به قطعات دنچر در نظر گرفته شد. (۲۱، ۲۴)

جدول ۱- میزان سلولهای شمارش شده کاندیدای چسبیده بر روی قطعات آکريلي در گروههای مورد بررسی قبل و بعد از انجام پروتکل ضدعفونی و درصد پاک کنندگی هر ماده (T test)

| شاخص | قبل از پروتکل | بعد از پروتکل | درصد کاهش (پاک کنندگی) | P-value |
|---------|---------------|---------------|------------------------|---------|
| پپسین | ۷/۱۴ ± ۱/۴۷ | ۳۶/۹ | کمتر از ۰/۰۰۱ | |
| پاپایین | ۲/۳۹ ± ۰/۷۶ | ۷۸/۹ | کمتر از ۰/۰۰۱ | |
| آمیلاز | ۱۱/۳۲ ± ۳/۱۵ | ۸/۲۲ ± ۱/۲۹ | کمتر از ۰/۰۰۱ | |
| آب مقطر | ۹/۶۶ ± ۱/۵۴ | ۱۴/۷ | ۰/۰۲۵ | |
| (کنترل) | | | | |

همانگونه که در این جدول مشخص است، محلول آنزیم پاپایین دارای بیشترین قدرت پاک کنندگی در بین آنزیمهای مورد بررسی بوده است، بطوری که توانسته ۷۸/۹ درصد از سلولهای کاندیدای متصل شده به قطعات آکريل را جدا نماید؛ این در حالی است که آنزیم آمیلاز دارای حداقل خواص پاک کنندگی بوده، بطوریکه تنها ۲۷/۴ درصد سلولهای کاندیدای چسبیده به قطعات دنچر را جدا نموده است. (جدول ۱)

بحث:

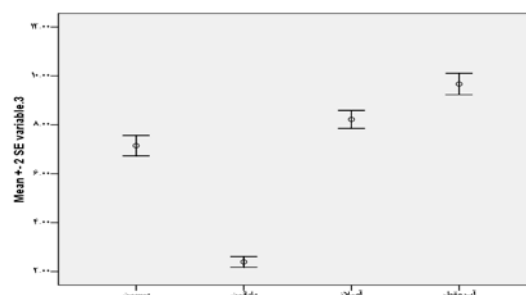
این مطالعه با هدف ارزیابی میزان اثربخشی محلول ۳ نوع آنزیم بر بیوفيلم کاندیدایی انجام گرفته است. این نتایج نشان می دهد که در بین آنزیمهای استفاده شده، محلول آنزیمی پاپایین بیشترین و محلول آنزیمی آمیلاز کمترین اثر را در پاک کردن کاندیدا آلبیکنس از آکريل دارند Canay و همکاران با روشی تقریباً مشابه مطالعه حاضر، اثر محلولهای آنزیمی پاپایین، تریپسین و آمیلاز را بر روی سلولهای کاندیدا آلبیکنس بررسی کردند، نتایج بدست آمده حاکی از اثر ۸۰ درصدی پاپایین، ۵ درصدی تریپسین و بی اثر بودن آمیلاز بوده است.^(۲۱) نتیجه اثر پاپایین در مطالعه Canay (۸۰ درصد) و مطالعه حاضر (۷۸/۹ درصد) تقریباً مشابه است اما در مورد آنزیم آمیلاز تفاوت وجود دارد که علت این امر احتمالاً بدلیل تفاوت در حجم نمونهها (که تعداد نمونههای این مطالعه ۲۲۰ قطعه آکريلي و در

چسبیده به قطعات دنچر بعد از ضدعفونی در نظر گرفته شدند. پس از جمع آوری اطلاعات و ورود در نرم افزار آماری SPSS16 توسط روش های آمار توصیفی (میانگین- انحراف معیار) و آزمونهای آماری ANOVA و T test، تجزیه و تحلیل انجام شد

یافته ها:

قبل از انجام ضدعفونی، سلول های کاندیدای چسبیده به ۲۰ قطعه آکريلي محاسبه و عدد حاصل یعنی $11/32 \pm 3/15$ به عنوان تعداد اولیه سلولهای کاندیدا در نظر گرفته شد. پس از انجام ضدعفونی و شستشو و رنگ آمیزی، سلول های کاندیدای چسبیده به قطعات آکريلي شمارش شدند. وضعیت تعداد سلولهای شمارش شده کاندیدای چسبیده بر روی قطعات آکريلي در سه نوع آنزیم مد نظر و گروه کنترل (آب مقطر) طی نمودار ۱ نشان داده شده است. به منظور مقایسه میانگین تعداد سلولهای شمارش شده در گروههای مد نظر از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA یک طرفه) استفاده گردید که نتیجه به دست آمده اختلاف معنی داری را بین گروه های مورد نظر نشان داد، ($P=0/001$)

میانگین تعداد سلولهای شمارش شده کاندیدای چسبیده بر روی قطعات آکريلي نشان می دهد پاپایین با کمترین میانگین، بیشترین اثر را در برطرف کردن کاندیدا و سپس پپسین و بعد از آن آمیلاز و در آخر آب مقطر استریل (گروه کنترل) با بیشترین میانگین کمترین اثر را داشته است. میزان اثر پاک کنندگی محلولهای مورد آزمایش به صورت درصد در جدول ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- میزان سلول های شمارش شده کاندیدای چسبیده بر روی

قطعات آکريلي بر حسب نوع محلول

نتیجه گیری

به نظر می رسد که محلول های آنزیمی تأثیر مطلوبی بر حذف کاندیدا آلبیکنس از روی قطعات آکريل دارند. محلول آنزیم پاپاین در بین آنزیمهای استفاده شده، بیشترین اثربخشی را در پاک کردن کاندیدای چسبیده از روی سطح قطعات آکريل دارد استفاده از محلول این آنزیم می تواند برای شستشو و ضد عفونی شبانه دنچر، مؤثر و مفید باشد. با توجه به تأثیر مطلوب آنزیمهایی مانند پاپاین بر روی پاک کردن کاندیداهای چسبیده به قطعات آکريل در مطالعه اخیر، پیشنهاد می شود مطالعه دیگری با هدف بررسی نقش و تأثیر این مواد بر روی کاهش میزان آلودگی میکروبی و از جمله بیوفیلم کاندیدایی دنچر افراد دارای دنچر انجام شود.

تشکر و قدر دانی

از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد بدلیل حمایت مالی از این پایان نامه (۴۷۴) و همچنین از سرکار خانم غفورزاده که در انجام فعالیتهای آزمایشگاهی این پایان نامه ما را یاری داده اند کمال تشکر و قدردانی بعمل می آید.

مطالعه Canay تنها ۵۰ قطعه بوده است) و هم چنین اختلاف در روش آزمایش بوده است.

در مطالعه ای دیگر، Karaagaclioglu و همکاران اثر ۵ آنزیم پروتئاز، لیپاز، پپسین، تریپسین و آمیلاز را در بر طرف کردن کاندیدا آلبیکنس از روی نمونه های تهیه شده از ۵ نوع ماده سازنده دنچر بررسی کردند، نتایج نشان داد که تمامی این آنزیمها بر روی کاندیدا مؤثر بودند، اما آنزیمهای پروتئاز و لیپاز نسبت به پپسین، تریپسین و آمیلاز مؤثرتر بوده، به طوری که نتیجه کشت نمونه های پروتئاز و لیپاز صفر گزارش شده است.^(۲۵) نتایج مطالعه Karaagaclioglu از این نظر با مطالعه حاضر هماهنگی دارد که در هر دو این مطالعات آنزیمهای پپسین و آمیلاز تأثیر کمتری از سایر آنزیمهای مورد بررسی (پاپاین در مطالعه حاضر) داشته اند. این آنزیمها باعث شکستن ماکرومولکولهای گلیکوپروتئین و موکوپلی ساکاریدهای موجود در پلاک دنچر شده و بر علیه هردو باکتریها و قارچها موثراند. آنزیمها در برداشت رسوبات سنگین پلاک میکروبی روی دنچر مفید بوده و مانع تشکیل پلاک جدید میکروبی میشوند؛ این در حالی است که این آنزیمها برای بافتهای زنده ضرری ندارند.^(۲۱)

References:

- 1- Shayegh S, salari A. A study of the prevalence of edentulous cases in Iran during 1998-1999. J Dent Sch. 2003; 21 (1): 61-65 [Persian]
- 2- Lesolang RR, Motloba DP, Lalloo R. Patterns and reason for tooth extraction at the Winterveldt Clinic: 1998-2002. SADJ. 2009 Jun; 64(5): 214-5, 218.
- 3- Gift HC, Redford M. Oral health and quality of life. Clin Geriatr Med. 1992 Aug; 8(3): 673-83.
- 4- Redford M, Drury TF, Kingman A, Brown LJ. Denture use and the technical quality of dental prostheses among person 18-74 years of age: United States, 1988-1991. J Dent Res. 1996 Feb; 75 Spec No: 714-25.
- 5- Douglass CW, Gammon MD, Atwood DA. Need and effective demand for prosthodontic treatment. J Prosthet Dent. 1988 Jan; 59(1): 94-104.
- 6- Asadzadeh Aghdaee N, Rostamkhani F, Ahmadi M. Complication of complete dentures made in the Mashhad dental school. Mashhad University of Medical Sciences 2007; 31(Special Issue): 1-3. [Persian]
- 7- Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. J Prosthodont. 2011 Jun; 20(4): 251-60
- 8- Atashrazm P, Sadri D. Prevalance of oral mucosal lesions in a group of Iranian dependent elderly complete denture wears. Journal of contemp Dent pract 2011; 14(2): 174-8
- 9- Salerno C, Pascale M, Contald M, Esposito V, Busciolano M, Millio L, et al. Candida-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Mar 1; 16(2): e139-43.
- 10- Tamamoto M, Hamada T, Miyake Y, Suganaka H. Ability of enzyme to remove candida. J Prosthet Dent. 1985 Feb; 53(2): 214-6.

- 11- Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wears. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1975 May;3(3):115-9.
- 12- Vojdani M, Nejabat N, Sayyadi M. Fungal and bacterial contamination of dental prostheses made in the laboratories of the Shiraz city. *Payeshjournal* 2006; 5(2):155-161.
- 13- Kossioni AE. The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population. *Gerodontology.* 2011 Jun;28(2):85-90
- 14- Jnanadev KR, Satish Babu CL, Shilpa Shetty S, Surendra Kumar G P, Sheetal HS. Disinfecting the acrylic resin plate using electrolyzed acid water and 2% glutaraldehyde: a comparative microbiological study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2011 Mar;11(1):36-44.
- 15- Vojdani M, Zibaei M. Frequency of bacteria and fungi isolated from pumices in dental laboratories. *J Res Health* 2006; 6(1): 33-38.
- 16- Sato S, Cavalcante MR, Orsi IA, Paranhos Hde F, Zaniquelli O. Assessment of flexural strength and color alteration of heat-polymerized acrylic resins after stimulated use of denture cleansers. *Braz Dent J.* 2005;16(2):124-8.
- 17- Nirale RM, Thombre R, Kubasad G. Comparative evaluation of sodium hypochlorite and microwave disinfection on dimensional stability of denture bases. *J Adv Prosthodont.* 2012 Feb;4(1):24-9.
- 18- Poorshahab M, Mostafapour R, Maktabkhan F. Comparison of the influence of 3 types of Denture cleanser on color change of acrylic resin of denture base. *JRDS.* 2012;9(1):15-19.
- 19- Ghahremani L, Rahbar M, Hesami A. In vitro evaluation of candida albicans adherence and growth on GC and acropars soft liners. *JRDS.* 2010;7(3):8-14.
- 20- Jafari AA, Falah-Tafti A, Lotfi-Kamran MH, Zahraei A, Kazemi A. Vinegar as a Removing Agent of Candida albicans From Acrylic Resin Plates. *Jundishapur J Microbiol.* 2012; 5(2):388-92.
- 21- Canay S, Erguven S, Yulug N. The function of enzymes in removing Candida accumulated on denture plaque. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 1991; 25(1):71-9.
- 22- Martin MV, Lamb DJ. Frequency of Candida albicans serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. *J Clin Pathol.* 1982 Aug;35(8):888-91.
- 23- Viglid M. Oral mucosal lesion among institutionalized elderly in Denmark. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1987 Dec;15(6):309-13.
- 24- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review Part 2. *Aust Dent J.* 1998 Jun;43(3):160-6.
- 25- Karaagaciloglu L, Turkoz Y, Misirligil A. Effects of various enzymes on Candida albicans activity on denture base materials. *Ankara Univ Hekim Fak Derg.* 1989 May;16(1):1-5.